

DIALOG(R)File 352:DERWENT WPI
(c)1999 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

012078631

WPI Acc No: 98-495542/199842

XRAM Acc No: C98-149236

Immune tolerance inducer for patients undergoing organ transplant - comprises medicinal compositions for intra-portal and intravenous administration comprising tolerogens which contain haematopoietic cells, pre-haematopoietic cells and/or mature lymphocytes

Patent Assignee: OTSUKA PHARM CO LTD (SAKA)

Inventor: ADACHI M; IKEHARA S; JIN T; MORITA H; SOGO S; SUGIURA K; YAMANISHI K

Number of Countries: 019 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
WO 9839016	A1	19980911	WO 98JP909	A	19980304	A61K-035/28	199842 B
JP 10306027	A	19981117	JP 97155015	A	19970612	A61K-035/14	199905

Priority Applications (No Type Date): JP 97346737 A 19971216; JP 9752930 A 19970307; JP 97155015 A 19970612

Language, Pages: WO 9839016 (J, 37); JP 10306027 (7)

Abstract (Basic): WO 9839016 A

An immune tolerance inducer for inducing immune tolerance in patients undergoing organ transplant comprises: (a) a first medicinal composition for intraportal administration which contains tolerogens containing haematopoietic cells, prehaematopoietic cells, mature lymphocytes or their mixtures as active ingredient; and (b) a second medicinal composition for intravenous administration which contains the above tolerogens and carrier. Also claimed are: (i) a drug for single administration to induce immune tolerance together with radiation comprising the above active ingredient and carrier; (ii) a method for inducing immune tolerance by administration of either of the above drugs; and (iii) production of the drugs using the tolerogens.

USE - The inducer is useful for sustaining transplanted organs without resorting to immunosuppressants and is especially useful in combination with radiotherapy (claimed).

ADVANTAGE - The method presents a procedure with little invasion.

Dwg.0/2



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 A61K 35/28, 35/14	A1	(11) 国際公開番号 WO98/39016 (43) 国際公開日 1998年9月11日(11.09.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00909 (22) 国際出願日 1998年3月4日(04.03.98) (30) 優先権データ 特願平9/52930 1997年3月7日(07.03.97) JP 特願平9/155015 1997年6月12日(12.06.97) JP 特願平9/346737 1997年12月16日(16.12.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒101-0048 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 金 鉄南(JIN, Tienan)(CN/JP) 〒536-0012 大阪府大阪市城東区天王田4丁目29-401号 Osaka, (JP) 杉浦喜久弥(SUGIURA, Kikuya)(JP/JP) 〒573-1155 大阪府枚方市招堤南町1-47-1-105 Osaka, (JP) 森田治雄(MORITA, Haruo)(JP/JP) 〒535-0003 大阪府大阪市旭区中宮2-14-5 Osaka, (JP)		池原 進(IKEHARA, Susumu)(JP/JP) 〒534-0016 大阪府大阪市都島区友誼町1丁目5-8-1004 Osaka, (JP) 十河真司(SOGO, Shinji)(JP/JP) 〒770-0943 徳島県徳島市中昭和町2-39-1-205 Tokushima, (JP) 山西一也(YAMANISHI, Kazuya)(JP/JP) 〒770-8012 徳島県徳島市大原町東千代ヶ丸19-139 Tokushima, (JP) 足立正一(ADACHI, Masakazu)(JP/JP) 〒370-0864 群馬県高崎市石原町3493-9 Gunma, (JP) (74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP) (81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: IMMUNE TOLERANCE INDUCERS (54) 発明の名称 免疫寛容誘導剤 (57) Abstract Novel immune tolerance inducers with which immune tolerance can be induced by a procedure with little invasion and thus transplanted organs can be sustained without resort to immunosuppressants. The above immune tolerance inducers are drugs consisting of a first medicinal composition for intraportal administration which contains as the active ingredient tolerogens containing hematopoietic cells, prehematopoietic cells, mature lymphocytes or mixtures thereof and a second medicinal composition for intravenous administration which contains as the active ingredient the above tolerogens, or drugs for single administration which are to be used in inducing immune tolerance together with radiation and contain as the active ingredient tolerogens containing hematopoietic cells, prehematopoietic cells or mixtures thereof.		

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

[illegible]

明 細 書

免疫寛容誘導剤

技 術 分 野

本発明は、臓器移植、より詳しくは移植された臓器の
5 維持、を可能とする免疫寛容を達成できる免疫寛容誘導
剤に関する。

背 景 技 術

臓器移植にとり、免疫抑制剤は不可欠の存在となっ
ており、目下、次々と新たな免疫抑制剤が開発されている。
10 かかる免疫抑制剤は、その使用目的（用途）から、2つ
に分けられる。一方は、予防的に拒絶反応を抑制する目
的で、連日、移植臓器が体内にある限り服用され続ける
ものであり、維持免疫抑制剤、予防的免疫抑制剤、基礎
的免疫抑制剤等と呼ばれる。他方は、維持免疫抑制をし
15 ているにも拘わらず発症する拒絶反応、主として細胞性
拒絶反応を治療する目的で、短期間ではあるが、強力に
免疫抑制を行うために大量用いられるものであり、拒絶
反応治療剤等と呼ばれる。

しかしながら、之等の免疫抑制剤は、その主作用及び
20 副作用のいずれもが人体にとり無害とはいえず、その長
期投与による維持や大量投与等を必要とするため、いず
れも無視できないかなりの毒性乃至副作用を伴う。また、

上記免疫抑制剤の単独投与では十分な免疫抑制効果を奏し得ず、発症した拒絶反応を高率に治療することはできない。

一方、臨床的に免疫抑制剤の投与がなされていなかったにも拘わらず、移植臓器が無事に維持される報告が散見されており、これは免疫寛容状態が誘導されたためと考えられている。かかる免疫寛容の成立によれば、上記免疫抑制剤の投与は不要となる。従って、人為的に免疫寛容を誘導することが臓器移植における最終目標として注目され、これについて種々の研究成果が報告されている。

かかる人為的な免疫寛容誘導方法としては、例えば、以下の報告が参照される。

脾臓細胞や骨髄細胞の寛容原 (tolerogen) 移入と抗有糸分裂剤 (antimitotic drug) との併用による寛容誘導 [Fukuoka Acta Med., 81(1), 20-40 (1990); Microbiol. Immunol., 32(3), 283-292 (1988)等]。

ここで、抗有糸分裂剤としては、6-メルカプトプリン (6-mercaptopurine)、メソトレキセート (methotrexate)、サイクロホスファミド (cyclophosphamide, CP)、5-フルオロウラシル (5-fluorouracil)、アザチオプリン (azathioprine, AZP)

及びプロカルバジン (procarbazine) 等が挙げられ、シクロスポリン A (ciclosporin A, CsA) やステロイド類は、之等抗有糸分裂剤とは作用機構が顕著に相違することから、免疫寛容の誘導には適さないものとされている。

- 5 早川らは、FK 506 を用いてドナー特異的な免疫抑制状態を誘導する試みを報告している〔慶応医学、72(3), 163-176 (1995)〕。同様に、村松らは、15-D SG による免疫寛容導入の可能性について報告している〔第20回日本マイクロサージャリー学会抄録、89-90頁 (1994)〕。
- 10 また、本発明者は先に、マウスを用いて、骨髓細胞（特に造血幹細胞）を門脈内又は静脈内投与すると肝臓に捕捉され、キメリズムが成立し、免疫学的寛容が誘導されることを報告している〔Eur. J. Immunol., 24: 1558 (1994)〕。
- 15 本発明の目的は、臓器移植において所望の免疫寛容を達成させる（成立させる）技術を提供することにある。即ち、現在の免疫抑制剤による維持（免疫抑制剤の長期投与）を必要とせず、従ってこれに伴われる重大な副作用等を確実に回避して、確実に移植臓器の維持を可能と
- 20 する新しい技術を提供することにある。

本発明者らは鋭意研究の結果、下記構成の医薬品が上記目的に合致することを見出し、ここに本発明を完成す

るに至った。

発 明 の 開 示

本発明によれば、まず、臓器移植術を施される患者に免疫寛容を誘導するための医薬であって、造血幹細胞、
5 造血前駆細胞、成熟リンパ球又はそれら混合物を含む寛容原の有効量を製剤担体と共に含有する門脈内投与用第1医薬組成物及び上記寛容原の有効量を製剤担体と共に含有する静脈内投与用の第2医薬組成物からなることを特徴とする免疫寛容誘導剤、特に骨髓細胞を寛容原とする
10 上記免疫寛容誘導剤が提供される。

また本発明によれば、臓器移植術を施される患者に、放射線照射と共に適用して免疫寛容を誘導するための医薬であって、造血幹細胞、造血前駆細胞又はそれら混合物を含む寛容原の有効量を製剤担体と共に含有すること
15 を特徴とする免疫寛容誘導剤、特に骨髓細胞を寛容原とする上記免疫寛容誘導剤が提供される。

本発明免疫寛容誘導剤の利用によれば、前述した目的に合致する所望の免疫寛容を達成でき、臓器移植における移植臓器の良好な維持が可能となる。

20 本発明免疫寛容誘導剤は、上記の通り、門脈内投与用の第1医薬組成物と静脈内投与用の第2医薬組成物との両者を必須とし、その限りにおいて、それら組成物の医

薬形態や使用に供する形態等には特に制限はない。

例えば上記第1及び第2の医薬組成物は、一つの医薬形態中に含ませることができ、或いは所望により、それらを別途の医薬形態として分けておくこともできる。即ち、後述する本発明医薬の使用例に代表されるように、所望の免疫寛容を達成するという本発明の効果が奏される限りにおいて、その医薬形態乃至使用に供される形態には特に制限はない。

本発明に係わる第1及び第2の医薬組成物において共通する有効成分である、造血幹細胞、造血前駆細胞、成熟リンパ球又はそれら混合物を含む寛容原としては、例えば移植臓器ドナー（マウスでは、ドナーと同系）由来のものを挙げるができる。該有効成分は、上記各細胞を含む骨髓細胞、脾臓細胞、末梢血細胞又はそれらの混合物であることができる。

之等寛容原の分離及び単離は、公知の方法に従うことができ、例えば山本らの文献〔Blood, Vol. 88, pp445-454 (1996)〕や「細胞免疫実験操作法」〔Mishell B. B., Shgi S. M. 編、今井勝行、川口進、原田孝之供訳、理工学社、3-12頁、1982年〕等に記述されている方法等が参照される。

移植臓器ドナー（ヒト）からの寛容原としては、骨髓

細胞及び末梢血細胞の利用を好適に例示できる。それら細胞の取得は当業者に周知である。例えば、骨髓細胞の利用は、骨髓移植における場合に準ずることができる。

上記第1医薬組成物としては、造血前駆細胞を多く含む骨髓細胞、成熟リンパ球（活性化リンパ球を除く）を含む脾臓細胞、同末梢血細胞又はそれらの混合物からなる寛容原の利用が好ましく、一方、第2医薬組成物としては、上記骨髓細胞からなる寛容原の利用が望ましい。尚、上記第1及び第2医薬組成物の両者における有効成分としては、上記の通り骨髓細胞の利用が好ましいが、
10 その他にも、例えばG-CSF等のサイトカインで骨髓より動員される造血幹細胞を含む末梢血細胞は、成熟リンパ球及び造血前駆細胞の両者要素を含むことより、また細胞の入手が容易である点より、同様に好ましい有効
15 成分として利用できる。

第1及び第2の医薬組成物において、かかる有効成分は、通常この種の細胞成分からなる各種医薬製剤と同様に
にして、一般的な医薬製剤形態に調製することができる。かかる医薬製剤としては、各種の形態が所望により選
20 択できる。その代表的なものとしては、注射剤を例示することができる。之等の医薬製剤形態への調製に際し使用される製剤担体としては、この分野で従来よりよく知ら

れている薬学的に許容される各種のものを広く利用することができる。その調製も常法に従うことができる。之等の製剤の調製に際しては、また現在汎用されている各種の輸液用製剤の利用も可能である。

- 5 尚、本発明において上記医薬製剤は、移植に際して移植臓器ドナーより用時調製することもできる。

本発明における第1及び第2の医薬組成物において、第1医薬組成物は門脈内投与を必須とし、第2医薬組成物は静脈内投与を必須とする。之等各医薬組成物の投与
10 時期、投与量等は、所望の免疫寛容が達成されることを前提として、当業者により適宜決定でき、特に限定されるものではない。

代表的な投与の態様を例示すれば、まず第1医薬組成物を門脈内投与し、その後第2医薬組成物を静脈内投与
15 する。この第2の医薬組成物の静脈内投与は、第1の医薬組成物の門脈内投与後、脾細胞のリンパ球混合反応において宿主細胞のドナーのアロ抗原に対する反応性が最小となった（例えばマウスでは約4日目）後、再び上がりかけた時期（マウスでは5日目）に行われるのがよい。

- 20 第1医薬組成物の門脈内投与量は、門脈内投与後のリンパ球混合反応でドナーのアロ抗原に対する反応性が最小（反応抑制が最大）となる時期に反応抑制度がプラト

一に達するための最小用量（マウスでは 3×10^7 個）を目安とするのが適当である。

また、第2医薬組成物の静脈内投与量は、通常の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）不適合の骨髓移植（マウスでは致死量の放射線照射後）において、宿主の免疫系を再構築するのに十分な量（マウスでは 3×10^7 個）を目安とすることができる。

尚、上記において、脾細胞のリンパ球混合反応試験は、常法に従い実施することができる〔前記「細胞免疫実験
10 操作法」、147-149頁、1982年〕。また、ヒトにおける門脈内及び静脈内投与量は、通常の骨髓移植におけるそれらに準ずることができる。例えば、骨髓細胞として、 3×10^8 個/kg 程度或はそれ以上の投与量を例示することができる。

15 かくして、本発明の上記第1医薬組成物の門脈内投与に続く第2医薬組成物の静脈内投与によって、所望の免疫寛容が誘導され、移植臓器の良好な維持が可能となる。

従って、本発明はかかる特定の処置による免疫寛容誘導方法をも提供するものである。

20 本発明方法により達成される上記効果は、移植臓器の移植術施行の時期とは無関係である。従って、当該移植術は、本発明処置と平行して、或は本発明処置による免

疫寛容が達成された後のいずれにも良好に行うことができる。

尚、本発明に係わる免疫寛容の誘導に際しては、本発明の効果が害されない限りにおいて、通常この種の処置
5 に際して利用されることの知られている各種の医療処置
や他の医薬製剤の投与等を併用することもできる。

その例としては、前述した各種の免疫抑制剤の投与を
例示できる。この免疫抑制剤の投与は、用いられる免疫
抑制剤、その投与手段、投与量、投与時期等は、当業者
10 により適宜決定できる。

特に好ましい免疫抑制剤としては、代表的には、シク
ロスポリンA、FK506等を例示でき、その投与量、
用法等は既知の市販品のそれらに従うことができる。該
免疫抑制剤の投与は、特に、第1医薬組成物の門脈内投
15 与後、短期的に、例えば門脈内投与後2日目程度と5日
目程度の1乃至2回の免疫抑制剤の投与によるのが好ま
しい。

更に、本発明によれば、より侵襲の少ない処置で確実に
キメリズムを導入して、免疫寛容状態を長期間維持で
20 きる免疫寛容誘導技術が提供できる。

即ち、本発明によれば、臓器移植を施される患者に、
放射線照射と共に適用して免疫寛容を誘導するための医

薬であって、造血幹細胞、造血前駆細胞又はそれら混合物を含む寛容原の有効量を製剤担体と共に含有することを特徴とする免疫寛容誘導剤が提供される。

- かかる本発明免疫寛容誘導剤の門脈内又は静脈内への
- 5 単回投与による場合でも、これが放射線照射と共に患者に適用される場合は、前述した目的に合致する所望の免疫寛容を達成でき、臓器移植における移植臓器の良好な維持が可能となる。

- 上記放射線照射と共に適用される本発明医薬において
- 10 有効成分とする、造血幹細胞、造血前駆細胞又はそれら混合物を含む寛容原は、例えば造血幹細胞や造血前駆細胞を含む骨髓細胞、末梢血細胞、それらの混合物であることができる。

- 移植臓器ドナー（ヒト）からの該寛容原としては、骨
- 15 髄細胞、臍帯血細胞及びG-CSF等のサイトカインで動員される造血幹細胞を含む末梢血細胞を具体例として例示できる。

- 放射線照射と共に適用される本発明医薬における上記寛容原の分離及び単離技術、医薬の調製法、医薬形態、
- 20 医薬製剤の調製に用いられる製剤担体等、その投与経路、投与量において、前述した門脈内投与用第1医薬組成物及び静脈内投与用第2医薬組成物におけるそれらと同様

とすることができる。

但し、上記本発明医薬は、放射線照射と共に適用されること、即ち放射線照射される患者にこれを門脈内又は静脈内投与されることを必須とする。

- 5 その投与量は、通常の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）不適合の骨髄移植（マウスでは致死量の放射線照射後）において、宿主の免疫系を再構築するのに十分な量（マウスでは 3×10^7 個）を目安とすることができる。

- 10 上記マウスにおける投与量を目安として、また通常の骨髄移植におけるそれらに準じて、本発明医薬の投与量は適宜決定できる。その具体例としては、例えば骨髄細胞として 3×10^8 個/kg 程度或いはそれ以上を例示することができる。

- 15 ここで放射線照射は、常法に従うことができる。より具体的には、臓器移植術が施される患者（レシピエント）に、所定量の放射線、例えば全身照射（TBI）による1回の放射線照射として、6.5 Gy 以上で且つ致死量に満たない量（sublethal）、好ましくは7.0 Gy 程度の放射線を照射することにより実施される。かかる放射
20 線量は、レシピエントの骨髄細胞が回復する放射線量としても特徴付けられる。

上記放射線照射は、本発明医薬の投与の前に行うこと

ができ、通常、放射線照射後約 2 4 時間以内に投与されるのが好ましい。

かかる本発明によれば、レシピエントへの侵襲の少ない単回投与処置によって、本発明所望の効果が奏される

5 利点がある。

かくして、放射線照射との併用による本発明医薬の投与により、所望の免疫寛容が誘導され、移植臓器の良好な維持が可能となる。

本発明は、かかる放射線照射との併用による免疫寛容
10 誘導処置方法をも提供するものである。

かかる放射線照射との併用方法によって、所望の免疫寛容が誘導され、移植臓器の良好な維持が可能となる現象もまた、移植臓器の移植術施行の時期とは関係しない。

また、上記併用方法の実施に際しても、本発明の効果が
15 が害されない限りにおいて、更に通常この種の処置に際して利用される各種の医療処置や他の医薬製剤、例えばシクロスポリン A、FK 506 等の各種の免疫抑制剤等を併用することができる。

図面の簡単な説明

20 図 1 は、試験例 3 における皮膚移植生着の結果を示す図面である。

図 2 は、試験例 4 における皮膚移植生着の結果を示す

図面である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を更に詳しく説明するため、本発明有効成分につき行われた試験例を挙げる。

5 試験例 1

以下の試験例における免疫寛容誘導は、(1)異系ドナーの脾細胞又は骨髓細胞の門脈内注射及び(2)異系ドナーの骨髓細胞の静脈内注射によって行い、免疫寛容の成立は、拒絶反応を最も受けやすい臓器である皮膚（ドナーと同系）の移植による生着の程度を観察してその指標とした。

(1) 脾細胞浮遊液の調製

8週齢雌性BALB/cCrSlcマウス（体重19-22g, BALB/c; Japan SLC Inc.）より脾細胞を採取し、RPMI 1640溶液（Nikken Bio Med. Lab.）中において200ゲージのステンレススチールメッシュ上で無鉤ピンセットにてほぐし、単離脾臓細胞を得た。これをRPMI 1640溶液にて1回洗浄後、トリス塩酸アンモニウム溶液（0.75% NH_4Cl , 0.017M Tris-HCl, pH 7.5）にて溶血し、RPMI 1640溶液にて更に2回洗浄した後、同液中に脾細胞を浮遊させて脾細胞浮遊液（ $1.0 \times 10^8/\text{ml}$ 濃度）を調製した。

(2) 骨髓細胞浮遊液の調製

8 週齡雌性 B A L B / c マウスより大腿骨及び脛骨を取り外し、それぞれ膝関節側よりシリンジ (2.5ml, Code No. SS-02S, Terumo Co., Ltd.) につけた 22 ゲージ針 (Code No. NN-2225R, Terumo Co., Ltd.) を刺入し、

5 シリンジ中の R P M I 1 6 4 0 溶液にて骨髓細胞を滅菌シャーレ (90×15mm, Iwaki Clinical Test Ware) へ押し流した後、R P M I 1 6 4 0 溶液中に懸濁させ、得られる骨髓細胞を R P M I 1 6 4 0 溶液にて 1 回洗浄後、同溶液中に浮遊させて所望の骨髓細胞浮遊液 (1.0×10^8

10 /ml 濃度) を調製した。

(3) 門脈内注射

10 週齡雌性 C 5 7 B L / 6 C r S l c マウス (B 6 ; 体重 20-24 g、Japan SLC Inc.) をペントバルビタール (Pitman-Moor Inc.; 37.5mg/kg 体重 i. p.) 麻酔下にて剃

15 毛、消毒し、腹部正中切開を行った後、腸間膜を露出させ、1 ml ツベルクリン用シリンジにつけた 27 ゲージ針 (Terumo Co., Ltd.) を腸間膜脂肪組織を経て刺入させ、前記 (1) で調製した B A L B / c マウスの脾細胞又は骨髓細胞の 3×10^7 個 (浮遊液 0.3ml) を門脈内

20 に注射投与した。

(4) 静脈内注射

前記 (1) で得た骨髓細胞浮遊液を 1×10^8 /ml 濃

度に調整し、その 3×10^7 個 (0.3ml) を、上記 (3) の門脈内注射後 5 日目に、宿主マウスの尾静脈より注射投与した。

(5) 皮膚移植

- 5 門脈内注射後 7 日目に皮膚移植を行った。皮膚移植片の調整及び移植方法は、文献記載の方法 [Mayumi et al., Jpn. J. Surg., 18, 548-557 (1988)] を参照して、以下の通り行った。

即ち、8 週齢 B A L B / c マウスをドナーとして、エ
10 チルエーテル (Nacalai Tesque Inc.) 麻酔下で屠殺した。除毛剤 (Feather Hair Remover, Feather Safty Razor Co., Ltd.) にて全身の体毛を除去し、70% アルコール溶液にて除菌した後、皮膚全層を剥離採取した。ピンセット (先曲がり先細無鈎) 及び滅菌綿棒を用いて可及的
15 に皮下脂肪組織を剥離した後、皮膚片 (1.2×1.5 cm 四方) に細切し、頭側の一辺にマーカーとして 1 mm の切開を加え、冷却した無菌のリン酸緩衝食塩水 (Dulbecco's PBS(-), Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) 中に浮遊させた。

- 20 B 6 宿主マウスをペントバルビタール (37.5mg/kg 体重 i. p.) で麻酔した後、右背側部を手指による抜毛及び前記除毛剤により除毛 (3.0×3.5 cm 四方) し、70% アル

コール溶液にて除菌して移植のための術野を作製した。

剥離面に上記調製したBALB/cの皮膚片をマーカーを尾部に向けて設置し、6-0針付きナイロン縫合糸(Ethilon; Ethicon Inc.)にて8針(4辺の中央と4角)を縫合した。皮膚移植面を硫酸フラジオマイシン軟膏付きガーゼ(2.0×2.5cm四方, Sofratulle; Japan Roussel Co., Ltd.)で覆い、更に粘着性伸縮包帯(Elatex; Alcare Co., Ltd.)で巻いた。

皮膚移植生着の有無は、移植後2週間目より観察した。

10 (6) 結果

結果を下記表1に示す。

表 1

	寛容処置		皮膚移植生着	
	p. v. 投与	i. v. 投与	移植後経過時間(週)	生着率(%)
試験群 1	脾細胞	骨髓細胞	3 6	100(10/10)
試験群 2	脾細胞	脾細胞	1 8	20 (1/5)
試験群 3	骨髓細胞	骨髓細胞	3 6	67 (4/6)
対照群 1	脾細胞	—	3	0 (0/4)
対照群 2	骨髓細胞	—	3	0 (0/4)

(7) 結果の説明と考察

試験群 1 : BALB/c マウスの脾細胞を10匹の

MHCが不適合であるB6マウスの門脈内に注射後、5日目にBALB/cマウスの骨髄細胞を静脈内注射し、7日目に皮膚移植を行った結果、移植後36週目の時点で10匹中10匹のマウスで皮膚移植片が生着した。

- 5 試験群2：BALB/cマウスの脾細胞を5匹のB6マウスの門脈内に注射後、5日目にBALB/cマウスの脾細胞を静脈内注射し、7日目に皮膚移植を行った結果、移植後18週目の時点で5匹中1匹のマウスで移植片が生着したが、6週目で1匹、7週目で3匹のマウス
10 で皮膚移植片が拒絶された（脱落した）。

- 試験群3：BALB/cマウスの骨髄細胞を6匹のB6マウスの門脈内に注射後、5日目にBALB/cマウスの骨髄細胞を静脈内注射し、7日目に皮膚移植を行った結果、移植後36週目の時点で6匹中4匹のマウス
15 で皮膚移植片が生着した。

対照群1：BALB/cマウスの脾細胞を4匹のB6マウスの門脈内に注射後、7日目に皮膚移植を行った結果、移植後2週目で2匹のマウスで、また3週目で残りの2匹のマウスで、皮膚移植片が拒絶された（脱落した）。

- 20 対照群2：BALB/cマウスの骨髄細胞を4匹のB6マウスの門脈内に注射後、7日目に皮膚移植を行った結果、移植後2週目で2匹のマウスで、また3週目で

残りの 2 匹のマウスで皮膚移植片が拒絶された。

以上の結果から、第 1 医薬製剤の門脈内投与後における第 2 医薬製剤の静脈内投与によれば、長期に亘るドナー皮膚移植片の生着（ドナーのアロ抗原に特異的な免疫寛容の維持）が行い得ることが判る。

尚、上記試験群 3 において、骨髓細胞の門脈内投与（0 日目）と静脈内投与（5 日目）との間に、免疫抑制剤を投与すれば、皮膚移植片の生着率の向上が認められた。以下、このことを明らかにする試験例を挙げる。

10 試験例 2

（1）骨髓細胞の調製並びに門脈内及び静脈内注射

上記試験例 1 の（2）、（3）及び（4）と同様にした。

（2）免疫抑制剤の投与

15 免疫抑制剤としてシクロスポリン A（Ciclosporin A, Cs A: Sandimmun, 250mg/5ml 溶液, Novartis Pharma K. K.）10 mg / kg 体重もしくは FK 506（10mg/1ml 溶液, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.）1 mg / kg 体重を、門脈内注射後 2 日目と 5 日目に腹腔内注射した。

（3）皮膚移植

試験例 1 の（5）と同様とした。

(4) 結果

結果を下記表 2 に示す。

表 2

5	寛 容 処 置			皮 膚 移 植 生 着	
	p. v. 投与	免疫抑制剤投与	i. v. 投与	移植後経過時間(週)	生着率(%)
試験群3	骨髄細胞	—	骨髄細胞	3 6	67 (4/6)
試験群4	骨髄細胞	CsA	骨髄細胞	3 2	80 (4/5)
試験群5	骨髄細胞	FK506	骨髄細胞	3 0	83 (5/6)
対照群2	骨髄細胞	—	—	3	0 (0/4)

10

(5) 結果の説明と考察

試験群 3 及び対照群 2 については、試験例 1 に詳述した通りである。

試験群 4 : B A L B / c マウスの骨髄細胞を 5 匹の
 15 B 6 マウスの門脈内に注射後、2 日目と 5 日目に C s A
 を投与し、更に 5 日目に B A L B / c マウスの骨髄細胞
 を静脈内注射し、7 日目に皮膚移植を行った結果、移植
 後 6 週目で 1 匹のマウスで皮膚移植片が拒絶されたが、
 移植後 3 2 週目の時点で 5 匹中 4 匹のマウスで皮膚移植
 20 片が生着した。

試験群 5 : B A L B / c マウスの骨髄細胞を 6 匹の
 B 6 マウスの門脈内に注射後、2 日目と 5 日目に F K

506を投与し、更に5日目にBALB/cマウスの骨髓細胞を静脈内注射し、7日目に皮膚移植を行った結果、移植後6週目で1匹のマウスで皮膚移植片が拒絶されたが、移植後30週目の時点で6匹中5匹のマウスで皮膚移植片が生着した。

之等のことから次のことが判る。即ち、従来、CsAやFK506等の免疫抑制剤は、寛容原と併用して免疫寛容を誘導させるには適さないものとされてきたが、本発明に従う免疫誘導剤としての第1医薬組成物の門脈内
10 投与と第2医薬組成物の静脈内投与との組合せに、これを併用するときには、皮膚生着率の向上が認められ、免疫寛容にも有効であることが判明した。

以上のように本発明によれば、臨床的応用が十分に期待できる新しい免疫寛容誘導技術を提供できる。

15 試験例3

(1) 骨髓細胞の調製並びに門脈内及び静脈内注射

上記試験例1の(2)、(3)及び(4)と同様にした。

(2) 免疫抑制剤の投与

20 CsAの10mg/kg体重を、門脈内注射後、2日目と5日目に腹腔内注射した。

(3) 皮膚移植

門脈内注射と同日に皮膚移植を実施した以外は、上記試験例 1 の (5) と同様に行った ($n = 6$)。尚、対照として C 3 H マウス皮膚片を使用した群をおいた ($n = 4$)。

5 (4) 結果

結果を図 1 に示す。

同図において、縦軸は皮膚移植生着率 (%) を、横軸は皮膚移植からの経過時間 (週) を、グループ 1 は試験群を、グループ 2 は対照群をそれぞれ示す。

- 10 この試験例の結果により、第 1 医薬組成物の門脈内投与による免疫寛容誘導の操作と臓器移植とを同時に行うことが可能であることが判明した。それ故、ヒトの場合、脳死ドナーからの第 1 医薬組成物 (骨髄細胞等) の門脈内投与と臓器移植が同時に実施可能となる。この方法は、
- 15 骨髄中の T 細胞を除去しなくても移植片対宿主反応 (G v H R) も発症せず、免疫抑制剤も 2 回の投与で長期間の免疫寛容が可能となり、画期的な方法と考えられる。

試験例 4

- 20 免疫寛容誘導は、以下のとおり、異系ドナーの骨髄細胞の門脈内又は静脈内注射によって行い、免疫寛容の成立は、拒絶反応を最も受けやすい臓器である皮膚 (ドナ

ーと同系)の移植による生着の程度を観察してその指標とした。

(1) 骨髓細胞浮遊液の調製

ドナーマウスより大腿骨及び脛骨を取り外し、それぞれ、膝関節側よりシリンジ (2.5ml, Code No. SS-02S, Terumo Co., Ltd.) につけた 22 ゲージ針 (Code No. NN-2225R, Terumo Co., Ltd.) を刺入し、シリンジ中の R P M I 1 6 4 0 溶液にて骨髓細胞を滅菌シャーレ (90 × 15mm, Iwaki Clinical Test Ware) へ押し流した後、
10 R P M I 1 6 4 0 溶液中に懸濁させ、得られる骨髓細胞を R P M I 1 6 4 0 溶液にて 1 回洗浄後、同溶液中に浮遊させて所望の骨髓細胞浮遊液 (1×10^8 /ml 濃度) を調製した。

(2) 放射線照射

15 レシピエントマウスの放射線照射は、 ^{137}Cs を線源としたガンマセル 40 エグザクター (Nordion International Inc. 社製) を用いた 1 回の全身照射により行った。

(3) 門脈内注射

レシピエントマウスをペントバルビタール (Pitman-
20 Moor Inc.; 37.5mg/kg 体重 i. p.) 麻酔下にて剃毛、消毒し、腹部正中切開を行った後、腸間膜を露出させ、1ml-ツベルクリン用シリンジにつけた 27 ゲージ針 (Terumo

Co., Ltd.) を腸間膜脂肪組織を経て刺入させ、前記で調製したドナーマウスの骨髓細胞の 3×10^7 個 (浮遊液 0.3ml) を門脈内に注射投与した。

(4) 静脈内注射

- 5 前記で得たドナーマウスの骨髓細胞浮遊液を、 1×10^8 /ml 濃度に調整し、その 3×10^7 個 (0.3ml) をレシピエントマウスの尾静脈より注射投与した。

(5) 皮膚移植

- 皮膚移植片の調製及び移植方法は、文献記載の方法
10 [Mayumi et al., Jpn. J. Surg., 18, 548-557 (1988)] を参照して、以下の通り行った。

- 即ち、ドナーマウスをエチルエーテル (Nacalai
Tesque Inc.) 麻酔下で屠殺し、除毛剤 (Feather Hair
Remover, Feather Safty Razor Co., Ltd.) にて全身の
15 体毛を除去し、70% アルコール溶液にて除菌した後、皮膚全層を剥離採取した。ピンセット (先曲がり先細無鉤) 及び滅菌綿棒を用いて可及的に皮下脂肪組織を剥離後、皮膚片 (1.2×1.5 cm 四方) に細切し、頭側の一辺にマー
カーとして 1mm の切開を加え、冷却した無菌のリン酸緩衝
20 食塩水 (Dulbecco's PBS(-), Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) 中に浮遊させた。

レシピエントマウスをペントバルビタール (37.5 mg/

kg体重 i. p.) で麻酔した後、右背側部を手指による抜毛及び前記除毛剤により除毛 (3.0×3.5cm 四方) し、70% アルコール溶液にて除菌して移植のための術野を作製した。

- 5 剥離面に上記調製したドナーの皮膚片をマーカーを尾部に向けて設置し、6-0 針付きナイロン縫合糸 (Ethilon; Ethicon Inc.) にて 8 針 (4 辺の中央と 4 角) を縫合した。皮膚移植面を硫酸フラジオマイシン軟膏付きガーゼ (2.0×2.5cm 四方, Sofratulle; Japan Roussel Co., Ltd.) で覆い、更に粘着性伸縮包帯 (Elatex; Alcare Co., Ltd.) で巻いた。

(6) 寛容誘導

- ドナーとして、(BALB/c×DBA2) F₁ マウス (H-2K^d) (7-8週齢、19-20g、日本 S L C) を、レシピエントとして B 6 マウス (H-2K^b) (10-13週齢、20-23g、日本 S L C) を用い、レシピエントへの放射線照射 1 日後に、ドナー骨髓細胞を門脈内又は静脈内に投与した。皮膚移植は、骨髓細胞の門脈内又は静脈内投与と同日に実施し、皮膚移植生着の有無は、移植術後 3 週間目より観察した。

20 (7) 結果

結果を図 2 に示す。

図 2 において、縦軸は、皮膚生着率 (%) を、横軸は、

移植術後の経過週数（週）を示し、図中のグループ I は、放射線の 6.5 Gy 照射及び骨髓細胞の門脈内投与群（ $n = 3$ ）（Group I: 6.5Gy + pv($n: 3$ ））における結果を、同グループ II は、放射線の 7.0 Gy 照射及び骨髓細胞の門脈内投与（ $n = 9$ ）又は同静脈内投与群（ $n = 5$ ）（Group II: 7Gy + pv($n: 9$) or iv($n: 5$ ））における結果を、同グループ III は、放射線の 6.5 Gy 照射及び骨髓細胞の静脈内投与群（ $n = 7$ ）（Group III: 6.5Gy + iv($n: 7$ ））における結果を、同グループ IV は、放射線の 6.0 Gy 照射及び骨髓細胞の門脈内投与（ $n = 5$ ）又は同静脈内投与群（ $n = 3$ ）（Group IV: 6.0Gy + pv($n: 5$) or iv($n: 3$ ））における結果をそれぞれ示す。

（8）結果の説明

B6 マウスに 7.0 Gy、6.5 Gy 又は 6.0 Gy の TBI を行ない、約 24 時間後、（BALB/c × DBA/2）F1 マウス（CDF1）の骨髓細胞を門脈内（pv）又は静脈内（iv）に投与し、同日に皮膚移植を実施した。結果は、図 2 に示すように、7 Gy 照射したレシピエントマウスにおいては、門脈内及び静脈内投与群ともに、移植後 23 週（167 日）目の時点でドナー（CDF1）の皮膚移植片の生着率が 100% である（pv 投与群で 9 匹中 9 匹、iv 投与群で 5 匹中 5 匹生着）。それに対し

て、6. 0 Gy 照射したレシピエントマウスにおいては、門脈内及び静脈内投与群ともに、皮膚移植片は移植後3週以内に全てのレシピエントマウスで拒絶された（p v 投与群で5匹中5匹、i v 投与群で3匹中3匹拒絶）。

- 5 6. 5 Gy 照射したレシピエントマウスにおいては、移植後3週の時点で、静脈内投与群で7匹中1匹で皮膚移植片が拒絶されたが、門脈内投与群では13週の時点で3匹中3匹のレシピエントマウスで皮膚移植片が生着している。

10 (9) 考察

6. 5 Gy で門脈内投与群の方が生着がわずかに高かった。このことは、肝臓内にドナーの造血幹細胞が、より効率的に肝臓内にトラップされるため、レシピエントマウス内の放射線耐性の免疫担当細胞による拒絶反応から免れやすいためであると考えられる。

製剤例 1

- 骨髓細胞又は脾細胞を生理食塩水に懸濁して、 1×10^8 細胞 / ml の門脈投与用製剤を調製する。一方、骨髓細胞 1×10^8 細胞 / ml 生理食塩水の静脈投与用製剤を同様に調製する。

上記門脈投与用製剤は、ヒトの場合、通常 3×10^8 細胞 / kg 以上の骨髓細胞（T細胞が混入していても可）投

与量で投与されるのが好ましい。

製剤例 2

骨髓細胞を生理食塩水に懸濁して、 1×10^8 細胞 / ml の細胞浮遊液を調製する。門脈投与用として、ヒトの場合、通常 3×10^8 細胞 / kg 以上の骨髓細胞（2 % 程度以下の少量の T 細胞が混入していても可）投与量で投与されるのが好ましく、少なくとも当該投与量を含有する投与用形態である注射剤を調製する。これは、放射線照射と共に適用される免疫寛容誘導剤として有用である。

10

産業上の利用可能性

本発明免疫寛容誘導剤の利用によれば、臓器移植術を施される患者に免疫寛容を誘導でき、確実に移植臓器の維持が可能となる。

15

20

請 求 の 範 囲

1. 臓器移植術を施される患者に免疫寛容を誘導するための医薬であって、造血幹細胞、造血前駆細胞、成熟リンパ球又はそれら混合物を含む寛容原の有効量を製剤担体と共に含有する門脈内投与用第1医薬組成物及び上記寛容原の有効量を製剤担体と共に含有する静脈内投与用第2医薬組成物からなることを特徴とする免疫寛容誘導剤。
5
2. 寛容原が骨髓細胞である請求項1に記載の免疫寛容誘導剤。
10
3. 臓器移植術を施される患者に、放射線照射と共に適用して免疫寛容を誘導するための医薬であって、造血幹細胞、造血前駆細胞又はそれら混合物を含む寛容原の有効量を製剤担体と共に含有することを特徴とする免疫寛容誘導剤。
15
4. 寛容原が骨髓細胞である請求項3に記載の免疫寛容誘導剤。
5. 免疫寛容の誘導を所望される臓器移植術を施される患者に、造血幹細胞、造血前駆細胞、成熟リンパ球又はそれら混合物を含む寛容原の有効量を製剤担体と共に含有する門脈内投与用第1医薬組成物を門脈内投与する工程、及び、上記寛容原の有効量を製剤担体と共に含有
20

する静脈内投与用第2医薬組成物を静脈内投与する工程を含むことを特徴とする免疫寛容誘導方法。

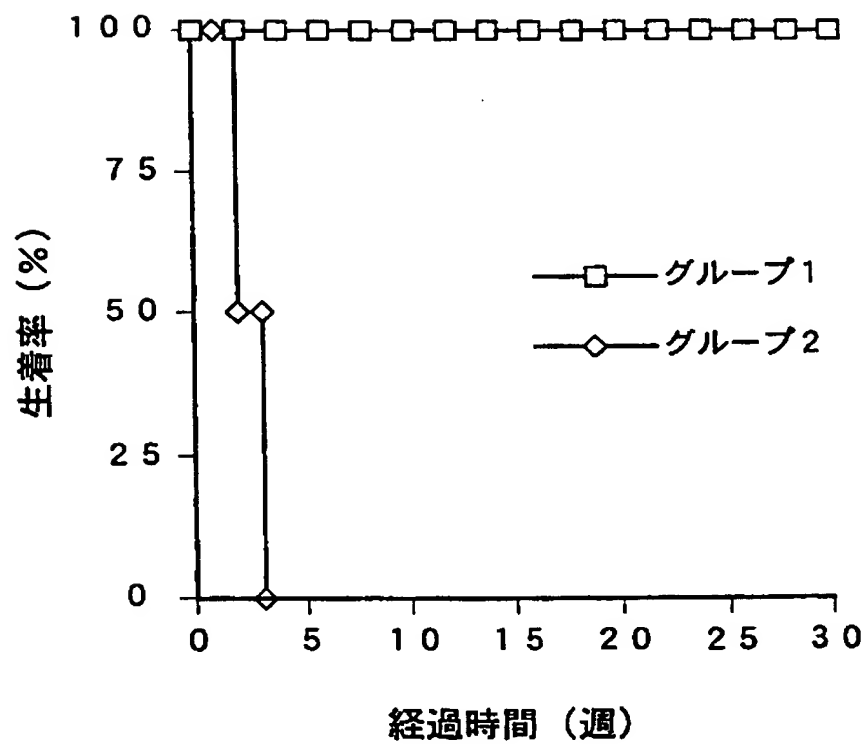
6. 門脈内投与と静脈内投与との間に、免疫抑制剤を投与する請求項5に記載の方法。

5 7. 免疫寛容の誘導を所望される臓器移植術を施される患者に、放射線照射する工程、及び、造血幹細胞、造血前駆細胞又はそれら混合物を含む寛容原の有効量を製剤担体と共に含有する医薬組成物を投与する工程を含むことを特徴とする免疫寛容誘導方法。

10 8. 臓器移植術を施される患者に免疫寛容を誘導する請求項1又は3に記載の免疫寛容誘導剤の製造のための、造血幹細胞、造血前駆細胞、成熟リンパ球細胞又はそれら混合物を含む寛容原の使用。

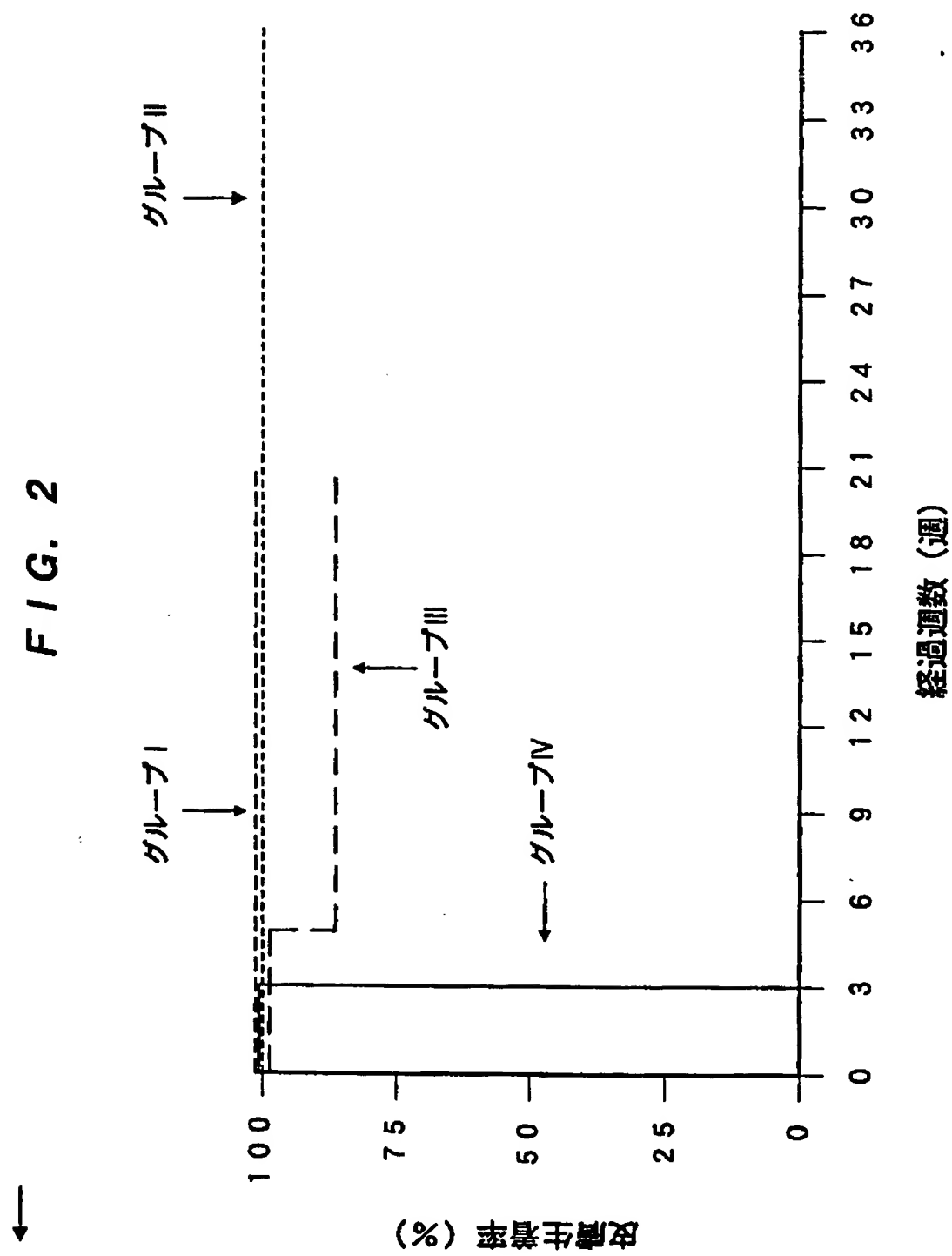
1 / 2

FIG. 1



2 / 2

FIG. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00909

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ A61K35/28, 35/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ A61K35/00-35/55

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1940-1998 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1998
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1998

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHANG, Y. et al., Eur. J. Immunol. 1994, Vol. 24, No. 7, pages 1558-1565	1-4, 8
A	JP, 60-502103, A (The Trustees of Columbia University in the City of New York), December 5, 1985 (05. 12. 85) & EP, 159325, A & US, 4861704, A & US, 4946438, A	1-4, 8
A	JP, 6-298654, A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), October 25, 1994 (25. 10. 94) (Family: none)	1-4, 8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
June 1, 1998 (01. 06. 98)

Date of mailing of the international search report
June 9, 1998 (09. 06. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.